

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 58-144748

(43)Date of publication of application : 29.08.1983

(51)Int.Cl.

G01N 33/54

(21)Application number : 57-027594

(71)Applicant : EIKEN KAGAKU KK

(22)Date of filing : 23.02.1982

(72)Inventor : TSUBOTA NORIYUKI  
OKA IMAO  
KAKISHIMA HIROSHI

## (54) LATEX REAGENT FOR IMMUNOLOGICAL REACTION

### (57)Abstract:

PURPOSE: To improve the preservative stability and the measuring sensitivity of a latex reagent by adding polypeptide to a suspension of latex particles to which an antigen or an antibody is sensitized at a specified rate per 100pts by volume.

CONSTITUTION: In a latex reagent for immunological reaction, polypeptide is added to a suspension of latex particles to which an antigen or an antibody is sensitized at a rate of 0.5W8.0pts. per 100pts by volume. The polypeptide herein used is 1,000W10,000 in the molecular weight, preferably 1,000W5,000 as desired. Such a polypeptide can be obtained, for example, by hydrolysis of gelatin, ovoalbumin, lactalbumin, serum albumin of an animal or the like by means of a protein decomposing enzyme, an acid or the like and refining the product by a proper means.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

①  
77:TD

アミン加水

⑩ 日本国特許庁 (JP)  
⑫ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開

昭58-144748

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>  
G 01 N 33/54

識別記号

庁内整理番号  
7906-2G

⑭ 公開 昭和58年(1983)8月29日

発明の数 1  
審査請求 有

(全 5 頁)

⑮ 免疫学的反応用ラテックス試薬

⑯ 特 願 昭57-27594  
⑰ 出 願 昭57(1982)2月23日  
⑱ 発 明 者 坪田宣之  
浦和市仲町2丁目8番11号  
⑲ 発 明 者 岡以万男  
埼玉県北足立郡伊奈町栄1丁目

33番2号  
⑳ 発 明 者 柿島博志  
東京都北区赤羽北3丁目11番7号  
㉑ 出 願 人 栄研化学株式会社  
東京都文京区本郷1丁目33番8号  
㉒ 代 理 人 弁理士 専優美 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

免疫学的反応用ラテックス試薬

2. 特許請求の範囲

- (1) 抗原または抗体を懸作したラテックス粒子の懸濁液100容量部当り0.5～8.0重量部の割合でポリペプチドを添加したことを特徴とする免疫学的反応用ラテックス試薬。
- (2) ポリペプチドの分子量が1,000～10,000である特許請求の範囲第1項記載の試薬。
- (3) ポリペプチドの分子量が1,000～5,000である特許請求の範囲第1項記載の試薬。

3. 発明の詳細な説明

本発明は安定な免疫学的反応用ラテックス試薬に関するものである。

血清、尿等の体液中に存在する抗原あるいは抗体を検出測定することは、疾患の診断に極めて重要な手段の一つである。特に免疫学的方法として、被検体液中に含まれる抗原あるいは抗体に、それらに対応する抗体あるいは抗原を感

作した微細粒子組体を用いさせ、抗原抗体反応によつて該微細粒子を凝集せしめ、凝集の有無の観察により、その凝集の程度あるいは凝集阻止程度を測定する凝集反応または凝集阻止反応(以下、両者を総称して凝集試験という)は、簡便かつ鋭敏な方法として広く行なわれている。

上記凝集試験において抗原または抗体を懸作するために用いられる微細粒子組体としては、赤血球、または非生物学的粒子であるベントナイト、コロイド粒子、カオリン、活性炭、ポリスチレンラテックス、ポリビニールトルエンラテックス、合成ゴムラテックス等があるが、それらの選択あるいは使用条件によつて、抗原または抗体の吸着性、懸作した微細粒子組体の保存安定性、該懸作組体による測定感度、免疫化学反応以外の現象に起因する非特異性凝集反応の発生等が大きく変化し、条件によつては、しばしば使用に耐えないという問題がある。

上記微細粒子組体のうち、ポリスチレンラテックス等の合成ラテックスは合成物質であるため、

保存時の安定性が他の担体よりも優れ、抗原、抗体等の蛋白質を強く吸着し、さらにこうして結合した抗原、抗体の性質を変化なく保持する点でも優れているため多くの免疫反応試薬に用いられ、特に感染反応試薬の担体として常用されている。

しかしながら、合成ラテックスにおいても、その保存中に自然凝集を起すことがある。この問題を防止するため、従来感作したラテックスの懸濁液にウレ血清アルブミン、ウマ血清アルブミン等のアルブミンを添加して、ラテックス粒子の表面荷電を負に維持することにより上記自然凝集を防止した免疫学的反応用ラテックス試薬が主として使用されていた。しかしながら、このようなアルブミン添加によつても長期間の保存においては感作ラテックスの自然凝集を阻止することは不可能であつた。したがつて自然凝集を生ずることなく、長期間保存しうる免疫学的反応用ラテックス試薬（以下、単にラテックス試薬という）の開発が強く要望されていた。

ラテックス試薬において、抗原または抗体を感作したラテックス粒子の懸濁液100容量部当り0.5～8.0重量部の割合でポリペプチドを添加したことを特徴とする安定化された免疫学的反応用ラテックス試薬を提供するものである。

本発明で用いられるポリペプチドは、分子量1,000～10,000、好ましくは分子量1,000～5,000の仕様のポリペプチドである。このようなポリペプチドは、例えばゼラチン、オボアルブミン、ラクトアルブミン、動物の血清アルブミン等を蛋白質分解酵素、酸、その他の適当な手段により加水分解し、適当な手段で精製して得ることができる。

ポリペプチドの分子量は、10,000より大きいときは従来の長期間保存時のラテックス試薬の非特異性凝集の問題が解消されず、1,000より小さいときは、添加による効果が十分得られないので、1,000～10,000の範囲でなければならない。

ポリペプチドの添加は、感作ラテックスを任

た。

このような状況に鑑み、本発明者等は鋭意研究の結果、感作したラテックスの表面を従来のようにアルブミンの添加により被覆しようとしても、アルブミンの分子量が大きいためにラテックス粒子表面を密に被覆して該表面の荷電を不活性化することができず、これが長期間保存したときの自然凝集の阻止を不可能にする原因であることが見出した。さらに、アルブミンは分子量が大きいため、ラテックスに感作した抗原あるいは抗体に対しても立体障害を及ぼして、抗原抗体反応を阻害し、試薬の測定感度を低下させることも見出した。

本発明者等は以上の知見に基づき、アルブミンの代りに分子量の小さいポリペプチドを感作ラテックスに添加することにより、ラテックス試薬の保存安定性および測定感度が従来に比べて大巾に改善されることを見出し、本発明を完成した。

したがつて、本発明は免疫学的反応用ラテ

意の濃度に水性懸濁液もしくは慣用の緩衝液に懸濁液100容量部当りポリペプチドを0.5～8.0重量部添加することにより行なう。0.5重量部より少ないとポリペプチドの添加によるラテックス試薬の安定化が十分でなく、8重量部より多いと感作ラテックス試薬の測定感度が低下するのでポリペプチドは0.5～8重量部で添加する。

本発明のラテックス試薬は懸濁液状態で長期間安定に保存しうるが、凍結乾燥状態で保存することもできる。

次に実施例により本発明をさらに詳しく説明する。

#### 実施例1A

##### 試薬の調製

- (1) 5%ポリスチレンラテックス液  
0.1Mグリシン食塩緩衝液(pH8.2)に5%ポリスチレンラテックスを浮遊させる。

- (2) 1%抗ヒト胎盤性ゴナドトロピンウチ

ヒ血清  $\gamma$ -グロブリン溶液

抗ヒト胎盤性ゴナドトロピンウサギ血清の  $\gamma$ -グロブリン分画を 0.1 M グリシン緩衝液 (pH 8.2) に 1 % 多になるように希釈する。

(3) 抗ヒト胎盤性ゴナドトロピンウサギ  $\gamma$ -グロブリン感作ラテックス試薬

前記(1)の 5 % 多ポリステレンラテックス溶液 1 容に前記(2)の抗ヒト胎盤性ゴナドトロピンウサギ血清  $\gamma$ -グロブリン溶液 4 容を加え、57℃で 1 時間感作後、氷冷する。次いで過心し、その沈渣をポリメブナド 0.5 ~ 16 % 多を含む 0.1 M グリシン緩衝液 (pH 8.2) にて濃度 0.5 ~ 1.0 % 多の感作ラテックス試薬懸濁液を調製する。

## (4) ポリメブナドの調製

ゼラチン 100.0 g に精製水 800 ml を加え、塩酸にて pH 1.8 とした後ペブレン 2 g を加えた。これを 37℃で 24 時間酵素分解した後、加熱処理し限外濾過器により分子量 1000 以上のものを濃縮する。

調製した感作ラテックス試薬懸濁液に 0.5 % 多となるように添加し、この懸濁液を 4℃に保存した。各保存期間後にこの試薬を用いて凝集反応によりヒト胎盤性ゴナドトロピンの測定を行なったところ、表 1 に示すように区分 2 のポリメブナドを添加した本発明の試薬は、従来のウレ血清アルブミンを安定剤として添加した試薬に比べ、測定感度および保存安定性が明らかに優れていた。

表 1

安定化剤 (濃度 0.5 %)	検出感度 (IU/ml)	保存安定性		
		6ヶ月	12ヶ月	24ヶ月
ウレ血清アルブミン (従来)	1.0	良	良	不良*
区分 1 (本発明外)	1.0	良	不良*	
区分 2 (ポリメブナド) (本発明)	0.5	良	良	良

\*不良とは凝集が出ないか出ても不鮮明であることを示す。

## 実施例 1 B

前記(3)で調製した抗ヒト胎盤性ゴナドトロピンウサギ  $\gamma$ -グロブリン感作ラテックス試薬懸濁

液にこの懸濁液を 4 × 60 cm のセファデックス - 25 カラムでゲル濾過し、第 1 図に示すように、ポイドポリウム付近に析出され高分子量の区分 1 およびそれ以外のポリメブナド区分 2 を別々に集めて濃縮後凍結乾燥し、区分 2 より得られたものをポリメブナドとする。

同様にラクトアルブミンあるいはオボアルブミン 100 g を 0.8 % 炭酸ナトリウム溶液に溶解し pH 7.8 にした後、パンクレアチン 10 g を加え 37℃で 72 時間酵素分解する。

以下、ゼラチンの場合と同様に処理してポリメブナドを得る。

なお、本実施例においては蛋白分解酵素としてペブレンまたはパンクレアチンを使用した。これらのみに限定されるものではない。

## (5) ポリメブナドによる感作ラテックス試薬の安定化

前記ゼラチンの酵素分解物よりゲル濾過して得られた区分 1 および区分 2 を、前記(3)で

液に、前記(4)で調製した酵素分解ゼラチンポリメブナドを各濃度に添加し、ポリメブナドの添加濃度とラテックス試薬の測定感度および保存安定性についてヒト胎盤性ゴナドトロピンとの凝集反応により調べた。

表 2

添加物	ポリメブナド 最終濃度(%)	濃度 (IU/ml)	保存安定性		
			6ヶ月	12ヶ月	24ヶ月
ゼラチン 酵素分解 ポリメブナド	0.1	0.5	不良		
	0.25	0.5	良	不良	
	0.5	0.5	良	良	良
	1.0	0.5	良	良	良
	2.0	0.5	良	良	良
	3.0	0.5	良	良	良
	4.0	0.5	良	良	良
	8.0	0.5	良	良	良
	16.0	1.5	良	良	良

表 2 に示した結果より、ポリメブナドの添加濃度は試薬の感度の点からは 8.0 % 以下であることが望ましく、試薬の保存安定性の点からは

0.5%以上であることが望ましい。この範囲の濃度でポリペプチドを添加した試薬は、24ヶ月以上4℃に保存した後使用しても感度は何ら変化しない。

#### 実施例2

##### 試薬の調製

##### (1) ホリスチレンラテックス液

実施例1A(1)と同様にして調製する。

##### (2) 1%w/v トキソプラズマ原虫液

トキソプラズマ原虫を0.1Mグリセリン緩衝液(pH 8.2)に1%w/vになるよう希釈する。

##### (3) トキソプラズマ原虫感作ラテックス試薬

前記実施例1A(3)の方法で抗ヒト胎盤性ゴナドトロピンウサギ血清ノグロブリン溶液の代りに上記(2)のトキソプラズマ原虫液を用いて感作ラテックス試薬懸濁液を調製する。

##### (4) ポリペプチド

実施例1A(4)と同様の方法でラクトアルブミンから酵素加水分解により調製する。

(5) ポリペプチドによる感作ラテックス試薬の安定化  
 実施例1と同様にしてポリペプチド(ゲル透過による区分2)を感作ラテックス試薬に各濃度で添加し、この試薬懸濁液を4℃に保存する。各保存期間後にこの試薬を用いて凝集反応によりトキソプラズマ原虫抗体の測定を行なったところ、表3に示すようにポリペプチドの添加濃度は試薬の感度の点からは8.0%以下、試薬の保存安定性の点からは0.5%以上であることが望ましい。この範囲の濃度でポリペプチドを添加した試薬は、24ヶ月以上4℃に保存した後使用しても感度は何ら変化しない。

表3

添加物	ポリペプチド 最終濃度(%)	感度	保存安定性		
			6ヶ月	12ヶ月	24ヶ月
ラクトアルブミン 酵素分解物	0.1	×128	不良		
	0.25	×128	やや不良	不良	
	0.5	×128	良	良	良
	1.0	×128	良	良	良

ラクトアルブミン 酵素分解物	2.0	×128	良	良	良
	3.0	×128	良	良	良
	4.0	×128	良	良	良
	8.0	×128	良	良	良
	16.0	×32	良	良	良

#### 4. 図面の簡単な説明

図はポリペプチド調製時のセファデックスG-25によるゲル透過の分離状態を示す。

特許出願人

榮研化学株式会社

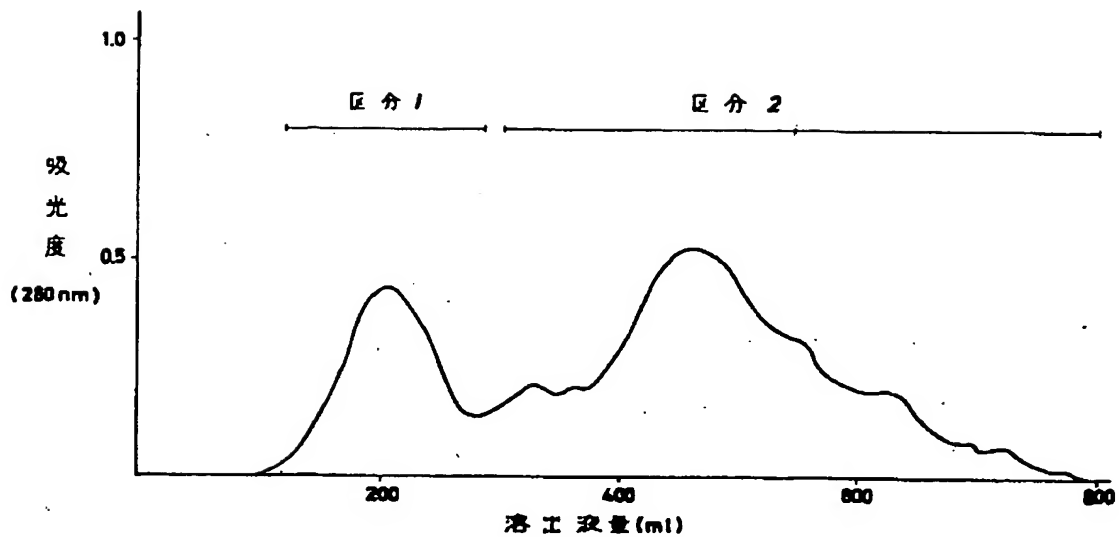
代理人 弁理士

専

優 美

(ほか1名)





### 手続補正書

昭和57年4月9日

特許庁長官・審判長殿

1. 事件の表示 昭和57年特許願第27594号

2. 発明の名称

免疫学的反应用ラテックス試薬

3. 補正する者

事件との関係 特許出願人

名称 アイソ化学株式会社

4. 代理人

住所 東京都千代田区神田駿河台1の6、主編の友ビル

氏名 (6271) 専 優 美

(ほか 1 名)



5. 補正命令の日付

昭和57年4月9日 「自発」

6. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄



### 7. 補正の内容

(1) 明細書第4頁第9行の「であることが」を「であることを」と補正する。

(2) 同第5頁第8行の「ものである。」を「ものである。」

本発明で用いられるラテックス粒子は、好ましくは粒径0.1~1.2μのものである。」と補正する。

(3) 同第11頁第9行、第10行、第13行、第16行および第12頁第8行の「原虫」を「抗原」と補正する。